

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 09296000 A

(43) Date of publication of application: 18.11.97

(51) Int. Cl

C07K 19/00
C07H 21/04
C07K 1/30
C07K 14/635
C12N 15/09
C12P 21/02
// C12N 9/50
(C12P 21/02 , C12R 1:19)

(21) Application number: 09063989

(22) Date of filing: 04.03.97

(30) Priority: 04.03.96 JP 08 70906

(71) Applicant: SUNTORY LTD

(72) Inventor: SUZUKI YUJI
MAGOTA KOJI
MASUDA TOYOFUMI

(54) CLEAVAGE OF CHIMERA PROTEIN WITH
PROCESSING ENZYME

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new chimera protein containing a part rich in histidine residues at the N-terminal and capable of being easily cleave with a processing enzyme to efficiently give an objective protein as a substrate for the production of the physiologically active peptide (precursor).

SOLUTION: A new chimera protein of the formula: A-L-B {A is a protecting protein; B is an objective protein; L is a linker peptide; the C-terminal part has the sequence: X1-X2-(Pro, Lys or Arg)-Arg (X1, X2 are each an arbitrary amino acid); the N-terminal part has a His-enriched part such as the sequence: [(His)₄-Pro-Gly]_n [(n) is 1-6]}. As a substrate for producing the physiologically active peptide

or its precursor, the chimera protein can easily be cleaved with a processing enzyme to efficiently give the objective protein. The chimera protein is obtained by expressing a vector containing a gene bound to a DNA coding the protecting peptide, the linker peptide and the objective peptide, respectively, in a host cell.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-296000

(43) 公開日 平成9年(1997)11月18日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 19/00			C 0 7 K 19/00	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 1/30			C 0 7 K 1/30	
14/635			14/635	
C 1 2 N 15/09	Z N A		C 1 2 P 21/02	C
審査請求 未請求 請求項の数17 F D (全 25 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平9-63989	(71) 出願人	000001904 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
(22) 出願日	平成9年(1997)3月4日	(72) 発明者	鈴木 雄司 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716番地1 サントリー株式会社医薬開発 研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平8-70906	(72) 発明者	孫田 浩二 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内
(32) 優先日	平8(1996)3月4日	(72) 発明者	増田 豊文 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 プロセッシング酵素を用いたキメラタンパク質の切断方法

(57) 【要約】

【課題】 目的タンパク質を含むキメラタンパク質であって、プロセッシング酵素により容易に開裂され、効率よく目的タンパク質が回収できるようにしたキメラタンパク質の提供。

【解決手段】 次の式：

A-L-B

〔式中、Aは、保護ペプチドであり；Bは、目的ペプチドであり；そしてLは、リンカーペプチドであって、そのC-末端部分に配列：X1-X2-(Pro, Lys又はArg)-Arg(式中、X1及びX2は任意のアミノ酸である)を有し、そしてN-末端にHisに富む部分を有する〕により表わされるキメラタンパク質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の式：

A-L-B

〔式中、Aは、保護ペプチドであり；Bは、目的ペプチドであり；そしてLは、リンカーペプチドであって、そのC-末端部分に配列：X1-X2-(Pro, Lys又はArg)-Arg(式中、X1及びX2は任意のアミノ酸である)を有し、そしてN-末端にHisに富む部分を有する〕により表わされるキメラタンパク質。

【請求項2】 前記N-末端のHisに富む部分が配列：[(His)₄-Pro-Gly]_n(式中、nは1～6である)を有する、請求項1に記載のキメラタンパク質。

【請求項3】 前記N-末端部分のアミノ酸配列と前記C-末端部分のアミノ酸配列との間に1～5個の任意のアミノ酸が存在する、請求項1又は2に記載のキメラタンパク質。

【請求項4】 X1がArg, Lys又はHisであり、そしてX2がHis又はPheである請求項1～3のいずれか1項に記載のキメラタンパク質。

【請求項5】 Aがアミノ酸配列；Pro-Arg, Arg-Arg及びLys-Argを含有しないポリペプチドである、請求項1～4のいずれか1項記載のキメラタンパク質。

【請求項6】 Aがアミノ酸配列；Pro-Arg, Arg-Arg又はLys-Argを含有するポリペプチドである場合、A中に該アミノ酸配列を含有しないように該アミノ酸配列中の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、請求項1～4のいずれか1項記載のキメラタンパク質。

【請求項7】 Aが220アミノ酸残基以下のポリペプチドである、請求項1～6のいずれか1項記載のキメラタンパク質。

【請求項8】 Aが大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼのN-末端側の1位のアミノ酸から97位、117位又は139位のアミノ酸までのペプチドである、請求項7記載のキメラタンパク質。

【請求項9】 A中のシステイン残基が他のアミノ酸に置換されている、請求項1～8のいずれか1項記載のキメラタンパク質。

【請求項10】 前記他のアミノ酸がセリン残基である、請求項9記載のキメラタンパク質。

【請求項11】 Bがヒト副甲状腺ホルモン又はその誘導体である、請求項1に記載のキメラタンパク質。

【請求項12】 前記ヒト副甲状腺ホルモン誘導体が、天然のヒト副甲状腺ホルモンのN-末端の1位又は3位のアミノ酸残基から、31位、34位、37位、38位もしくは84位のアミノ酸残基までの配列を有する断片、又はこれらのC-末端にGlyを付加した断片である、請求項11に記載のキメラタンパク質。

【請求項13】 BがGLP-1又はその誘導体である、請求項1に記載のキメラタンパク質。

【請求項14】 請求項1～13のいずれか1項に記載のキメラタンパク質の製造方法において、該キメラタンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、該培養物から前記キメラタンパク質を採取することを特徴とする方法。

【請求項15】 目的ペプチド(B)の製造方法において、請求項1～12のいずれか1項に記載のキメラタンパク質にプロセッシング酵素を作用させてリンカーペプチド(L)のC-末端と目的ペプチド(B)のN-末端との間のペプチド結合を切断し、目的ペプチド(B)を得ることを特徴とする方法。

【請求項16】 前記のプロセッシング酵素がKex2プロテアーゼ、フリン(Furin)、前駆体変換酵素1/3(PC1/3)もしくは前駆体変換酵素2(PC2)、又はこれらの誘導体である、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 目的ペプチド(B)を得る際に等電点沈澱処理を用いることを特徴とする、請求項14又は15に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生理活性ペプチドまたはその前駆体を生産する際に基質となるキメラタンパク質及びその生産方法に関する。本発明はさらには、該キメラタンパク質から該生理活性ペプチドを遊離させ、精製する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】キメラタンパク質発現法による多くのペプチド生産方法が試みられている。目的ペプチドの遊離方法として、化学的あるいは酵素による切断が用いられている。酵素としては、リジン残基のC末端側のペプチド結合を特異的に切断するリシルエンドペプチダーゼ(アクロモバクタープロテアーゼI)、グルタミン酸残基のC末端側を特異的に切断するスタフィロコッカルプロテアーゼV8などがある。化学的方法としては、亜硝酸によるアスパラギン残基の開裂、CNBrによるメチオニン残基の開裂などがある。

【0003】化学的方法は、目的ペプチドの修飾が避けられず、切断後の目的ペプチドの精製において種々の類似体からの精製が必要になる。一方、酵素切断方法は、特異性の高く、切断も比較的穏やかな条件で行われるため、目的ペプチドの精製が容易であるが、これらの酵素が利用可能か否かは目的ペプチドのアミノ酸配列に依存するため、既存のプロテアーゼが選択できない場合があり、汎用性の高い切断酵素が求められている。

【0004】ペプチドホルモン及びその前駆体が生体内で生成される際、該ペプチドのプレカーサーポリペプチ

ドが酵素（プロセッシング酵素）により特異的に切断される。該酵素には、前駆体変換酵素1/3（PC1/3）、前駆体変換酵素2（PC2）、フリン（*furin*）等が知られており、サッカロマイセス・セレビジアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）の α -因子（ α -matting factor）の生成時に機能するKex2プロテアーゼもその一種である。これらのプロセッシング酵素をキメラタンパク質からの目的ペプチドの切り出しに直接使用すれば、ペプチドホルモンを損なわず、かつ、多種多様のペプチドに適用できると期待できるため、このような生産方法が望まれていた。

【0005】本発明者らは、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ由来ポリペプチドを保護ペプチドとし、適切なリンカーペプチドを選び、目的ペプチドとのキメラタンパク質を大腸菌体内で、効率的に不溶性の封入体として生産する方法を報告した（特開平5-328992）。該キメラタンパク質は、尿素等の変性剤で可溶化され、プロセッシング酵素の基質とされる。

【0006】

【関連技術】一方、本発明者等は膜結合型酵素のサッカロマイセス・セレビジアエ由来のKex2プロテアーゼを、その遺伝子を改変することにより、可溶性酵素（分泌型Kex2誘導体）として生産する方法を報告した（「分泌型Kex2誘導体の製造方法」と題する平成8年3月4日出願の明細書）。しかし、本酵素をプロセッシング酵素として使用するにあたり、その基質となるキメラタンパク質の設計についての言及はなされていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】そこで、大量培養下、大腸菌体内で効率良く封入体として生産され、プロセッシング酵素が有効に作用する条件下で容易に可溶化されるキメラタンパク質を設計し、生産する方法、さらにはプロセッシング酵素により目的ペプチドがキメラタンパク質から効率よく切断される様に切断部位近傍のアミノ酸配列を設計し、生産する方法の開発が望まれていた。また、このようにして生産された生理活性ペプチドを99%以上の純度にも高回収率で精製する、汎用性の高い精製方法の開発も同時に望まれていた。従って、本発明は分泌Kex2誘導体のごときプロセッシング酵素を使用して生理活性ペプチドを生産する際に基質となるキメラタンパク質の設計、生産方法及び該ペプチドの精製方法を提供しようとするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、前記の課題の解決方法を検討した結果、1) キメラタンパク質に、Hisに富む配列、例えば{(His)_n-Pro-Gly}_n（n=1~6）を含むリンカーペプチドを挿入することが生産量の増加と分泌型Kex2誘導体のごときプロセッシング酵素反応条件下での溶解性の上昇

につながるという事実、2) リンカー内のプロセッシング酵素作用部位のアミノ酸配列をX1-X2-(Lys/Arg/Pro)-Argとし、望ましくは、X1としてLys、Arg又はHisを選択し、X2としてHis又はPheを選択することが、反応性の高い基質の条件であるという事実、さらに、

【0009】3) 反応後、反応液のpHを弱酸性にシフトし、さらに希釈して変性剤の濃度を低下させて目的ペプチド以外の成分のほとんどを沈殿させ、遠心分離あるいは圧搾濾過により目的ペプチドを95%以上上清に回収でき、そして例えば陽イオン交換クロマトグラフィー、低圧逆相クロマトグラフィー、逆相HPLC等を単独で又は好ましくは組合わせて使用することにより高純度かつ高回収率で目的ペプチドを精製できる、という事実を初めて明らかにし、本発明を完成した。

【0010】従って本発明は、次の式：

A-L-B

〔式中、Aは、保護ペプチドであり；Bは、目的ペプチドであり；そしてLは、リンカーペプチドであって、そのC-末端部分に配列：X1-X2-(Pro, Lys又はArg)-Arg（式中、X1及びX2は任意のアミノ酸である）を有し、そしてN-末端にHisに富む部分を有する〕

【0011】により表わされるキメラタンパク質を提供する。前記N-末端のHisに富む部分としては配列：[(His)_n-Pro-Gly]_n（式中、nは1~6である）が好ましく、またX1はArg, Lys又はHisであり、そしてX2はHis又はPheであることが好ましい。さらに、前記N-末端部分のアミノ酸配列と前記C-末端部分のアミノ酸配列との間に1~5個の任意のアミノ酸が存在していてもよい。本発明はまた、上記のキメラタンパク質の製造方法において、該キメラタンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、該培養物から前記キメラタンパク質を採取することを特徴とする方法を提供する。

【0012】本発明はさらに、前記の目的ペプチド(B)の製造方法において、前記のキメラタンパク質にプロセッシング酵素を作用させてリンカーペプチド(L)のC-末端と目的ペプチド(B)のN-末端との間のペプチド結合を切断し、目的ペプチド(B)を得ることを特徴とする方法を提供する。

【0013】上記の方法は、好ましい態様においては、キメラタンパク質をコードする遺伝子を発現できるベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、該形質転換体を破碎して封入体の不溶性画分を得、不溶性画分を可溶化剤で処理することで封入体中のキメラタンパク質を可溶化し、該可溶化されたキメラタンパク質の前記リンカーアミノ酸残基のC末端と前記目的ペプチドのN末端の間のペプチド結合を分泌型Kex

2誘導体のごときプロセッシング酵素により切断して該目的ペプチドを切り離し、沈殿処理、陽イオン交換クロマトグラフィー、低圧逆相クロマトグラフィー及び逆相HPLCにより該目的ペプチドを精製する。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の方法により、上記保護ペプチド、リンカー及び生理活性ペプチド（目的ペプチド）からなるキメラタンパク質をプロセッシング酵素により切断して、生理活性ペプチドを製造することができる。このようなペプチドとして、ヒト副甲状腺ホルモン（hPTH（1-84））及びその誘導体（hPTH（1-34）、hPTH（1-37）、hPTH（1-38））、ヒト副甲状腺ホルモンの他の誘導体（hPTH（1-31）Gly、hPTH（1-34）Gly、hPTH（1-37）Gly、hPTH（1-38）Gly、hPTH（3-84）、hPTH（3-34）、hPTH（3-37）、hPTH（3-38））、細胞増殖因子、カルシトニンおよびその前駆体、グルカゴン様タンパク質1（Glucagon-like peptide 1：GLP-1）及びその誘導体（GLP-1（1-37）GLP-1（7-37）、GLP-1（7-36）NH₂等）等をあげることができるが、これらに限定されるものではない。

【0015】また、プロセッシング酵素としては、Kex2プロテアーゼ、フリン（Furin）、前駆体変換酵素1（PC1）もしくは前駆体変換酵素2（PC2）又はこれらの誘導体等を使用することができるが、これらに限定されない。本発明においては特にKex2酵素のC-末端を除去することにより得られる分泌型Kex2誘導体が好ましい。

【0016】本発明における保護ペプチドは、その大きさが220アミノ酸以下のペプチドであることが好ましい。例えば、大腸菌βガラクトシダーゼのN末端の1位から90～210個のアミノ酸からなるものが好ましい。さらに好ましくは、大腸菌βガラクトシダーゼのN末端の1位から97位、117位又は139位からなるペプチドである。またさらに好ましくは、これらのペプチドのシステイン残基がセリン残基に置換されたものであり、最も好ましいのは、さらに14位のアルギニン残基がリジン残基に置換されたものである。また、保護ペプチド中にはプロセッシング酵素により認識される配列、例えばPro-Arg、Arg-Arg、Lys-Arg等、を含まないものが好ましく、保護ペプチド中に該認識配列がある場合には、そのような認識配列の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸で置換し、プロセッシング酵素により認識されない配列にすることにより、プロセッシング酵素による切断を防止することができる。

【0017】キメラタンパク質の溶解性を改善するためのリンカーアミノ酸としては、親水性のものが好まし

い。目的ペプチドの種類によってキメラタンパク質の電荷が変化し、封入体生産性の低下をもたらす場合があるため、親水性アミノ酸として、封入体生産の場合である菌体内の生理的pH（中性）近傍で緩衝能を持つヒスチジン残基を用いることが望ましい。さらに変性・可溶化後、リンカー部分の二次構造を緩やかなものにする目的でPro-Gly配列を挿入することが望ましい。多種の生理活性ペプチドに対応できるように、(His)₄-Pro-Glyをコードする合成DNAフラグメントを用意し、保護ペプチドをコードするDNAフラグメント中に適宜重複挿入させて、{(His)₄-Pro-Gly}_n（n=1～6）となるようにリンカーを設計することが最も好ましい。なお、以下このリンカーのN末端部分の配列をLNと記す。

【0018】さらに、本発明者等は、大量生産可能となったサッカロマイセス・セレビジア由来のKex2プロテアーゼ誘導体（分泌型Kex2誘導体）が、キメラタンパク質を基質とした場合、Kex2プロテアーゼ認識部位（Lys/Arg/Pro）-Arg近傍のアミノ酸もその活性に大きく影響することを初めて明らかにした。すなわち、リンカーのC末端に位置するアミノ酸配列を、X1-X2-（Lys/Arg/Pro）-Arg（式中X1、X2は任意のアミノ酸）とし、X1にはArg、Lys又はHisを、X2にはHis又はPheを用いた場合に分泌型Kex2誘導体活性が最大となることを明らかにした。なお、以下このリンカーのC末端部分の配列をLCと記す。

【0019】キメラタンパク質法で生産され切り出された目的ペプチドは、種々の手法で精製されるが、該キメラタンパク質を用いた場合、未反応キメラタンパク質、保護ペプチド類、大腸菌由来不純物を簡便な沈殿操作により、効率的に除去できることを明らかにした。すなわち、分泌型Kex2誘導体反応後、pHを弱酸性側にシフトし、さらに反応液を希釈して変性剤濃度を低下させることで、大腸菌由来不純物のほとんどと、未反応キメラタンパク質、保護ペプチド類を95%以上沈殿に移行させ、目的ペプチドを95%以上上清に保持でき、遠心分離あるいは圧搾濾過により目的ペプチドを含む清澄液を簡便に得られることを明らかにした。

【0020】本上清をpH調製等の後に直接陽イオン交換クロマトに通して目的ペプチドを吸着させ、塩濃度の変化あるいはpHの変化を利用して溶出させ、さらに溶出画分を低圧の逆相クロマトに通して目的ペプチドを吸着させ、有機溶媒濃度の変化を利用して溶出かつ濃縮させた。有機溶媒濃度を低下させた後、逆相HPLCに供し、有機溶媒濃度の変化を利用して分離分画し、高純度の目的ペプチドを得た。次に、本発明を目的ペプチドがヒト副甲状腺ホルモン誘導体hPTH（1-34）である場合を例にとって説明する。

【0021】βGal-210SPPH84発現用プラ

スミドpG210ShProPTHは、まずhPTH (1-84) 遺伝子を合成DNAオリゴマーの連結により作製し、次に作製した遺伝子をプラスミドpG210ShCT [G] のhCT [G] 遺伝子をコードする領域と置換して作製した(図3)。hPTH (1-84) 遺伝子のN末端から35番目のアミノ酸 (Val) をコードするコドン翻訳停止コドンに、βGal-210S (大腸菌β-ガラクトシダーゼのN末端1位から210位までのペプチドにおいて、システイン残基がセリン残基に置換されているペプチド) をコードする遺伝子をβGal-117S (大腸菌β-ガラクトシダーゼのN末端1位から117位までのペプチドにおいて、システイン残基がセリン残基に置換されているペプチド) をコードする遺伝子に変えたpG117SHPPH34を作製した(図6~7)。

【0022】同様に、βGal-210Sをコードする遺伝子に変えて、βGal-139Sをコードする遺伝子あるいはβGal-97Sをコードする遺伝子を挿入することにより、pG139SHPPH34あるいはpG97SHPPH34を作製することができる。これらのプラスミドは、それぞれβGal-97S、βGal-117S及びβGal-139Sをコードする構造遺伝子と誘導体hPTH (1-34) の構造遺伝子とがリンカーペプチドPhe-Met-Lys-Ser-Val-Lys-Lys-Argを介して連結されており、このキメラタンパク質をコードする構造遺伝子はlacプロモーターの制御下にある。またこのプラスミドはテトラサイクリン耐性遺伝子マーカーを含有する。

【0023】βGal-97SPPH34は分泌型Kex2誘導体反応条件下での溶解度が高かったが生産量が少なく、βGal-117SPPH34とβGal-139SPPH34は、生産量は多かったが該条件下での溶解性が低下し、キメラタンパク質から誘導体hPTH (1-34) を切り出すためには、より多くの分泌型Kex2誘導体が必要であった。そこで、生産量が多く尿素溶液の溶解度が高いキメラタンパク質を得るため、前記保護ペプチドとリンカーMet-Ser-Val-Lys-Lys-Argの間に、親水性かつ中性付近で緩衝能を持ち、キメラタンパク質の二次構造形成を阻害するアミノ酸からなるリンカーLNを挿入した。

【0024】LNとしては、{(His)₄-Pro-Gly}_n (n=1~6) からなるペプチドを用いた。{(His)₄-Pro-Gly}_n (n=1~6) の導入は、(His)₄-Pro-Glyまたは{(His)₄-Pro-Gly}₂をコードするDNAフラグメントを合成し、保護ペプチドをコードするDNAフラグメントの3'末端部分に適当なモル比で挿入反応させることで行い、前記アミノ酸配列を一つまたは複数個含有したリンカーペプチドを含むキメラタンパク質をコードする遺伝子を作製することができる。

【0025】なお、DNAフラグメントが反転して挿入されたものは、DNA塩基配列分析で確認し、除外した。これらのキメラタンパク質をコードするプラスミドで大腸菌M25株を形質転換し、キメラタンパク質の生産性を見た(図8)。その結果、保護ペプチドβGal-97SおよびβGal-139Sの場合はn=3で、βGal-117Sの場合はn=1~6で、キメラタンパク質の生産量が高いことがわかった。また、これらキメラタンパク質の封入体を菌体破碎、遠心分離により洗浄分離し、尿素で可溶化・希釈して、Kex2-660反応に供した(図9)。

【0026】その結果、{(His)₄-Pro-Gly}_n (n=1~6) の導入により、すべてのキメラタンパク質がKex2-660に対して感受性が高くなっていることがわかった。そこで、キメラタンパク質生産量、Kex2-660に対する反応性、および保護ペプチドの大きさを考慮し、hPTH (1-34) 生産用のキメラタンパク質には、保護ペプチドとしてβGal-117S、リンカーペプチドLNとして{(His)₄-Pro-Gly}からなるβGal-117S4HPPH34を採用した。

【0027】以上の結果より、分泌型Kex2誘導体により生理活性ペプチドを切り出すためのキメラタンパク質の設計として、大腸菌体内での生産性のみならず分泌型Kex2誘導体反応条件下での溶解性を改善するために、{(His)₄-Pro-Gly}_n (n=1~6) なるペプチドを挿入することが適していることを明らかにした。本過程では、分泌型Kex2誘導体がモル比でキメラタンパク質の1/1000程度必要であり、製造原材料費の大半を占めていた。そこで、さらに、分泌型Kex2誘導体により切断されやすいキメラタンパク質を設計する必要があった。βGal-117S4HPPH34の分泌型Kex2誘導体認識部位は、ヒト副甲状腺ホルモン前駆体のプロ配列Lys-Ser-Val-Lys-Lys-Argを使用した。

【0028】しかし、この配列が分泌型Kex2誘導体による切断に最適か否かは不明であり、多くの他のプロテアーゼに見られるように最適化によりさらに切断効率が増加する可能性が考えられる。認識部位のC末端側にはhPTH (1-34) が続いているのでアミノ酸の置換はできないが、N末端側の配列は新たに認識部位を創生しなければ任意に選択できる。そこで基質であるキメラタンパク質のP3部位(X2)を任意のアミノ酸に変換することを試みた。図10に示す18種類のアミノ酸配列について検討した結果、X2にHisまたはPheを導入すると、キメラタンパク質からのhPTH (1-34) の切り出し効率が良くなることが判明した。

【0029】次に、副反応が少なかったHisをX2に固定して、P4部位(X1)を図11に示す20種類のアミノ酸配列について検討した結果、X1にArg、L

ysまたはHisを導入すると、キメラタンパク質からのhPTH(1-34)の切り出し効率が良くなることが判明した。このうち最も切り出し効率が良かった、Arg-His-Lys-ArgをLCに選んだ。さらに本研究の過程で、βGal-117Sの13、14位に存在するArg-Arg配列のC末端側のペプチド結合が分泌型Kex2誘導体により切断され、この結果生じるβGal(1-14)が、後の酸性沈殿による精製工程において、hPTH(1-34)と同じ上清画分に回収されることが判明したので、14位のArgをLysに置換して切断を抑制し、βGal(1-14)の生成を抑えた。

【0030】以上の結果より、hPTH(1-34)生産用キメラタンパク質には、保護ペプチドとして14位のArgをLysに置換したβGal-117S(βGal-117KS)を、リンカーペプチドとしてPro-His-His-His-His-Pro-Gly-Gly-Arg-Pro-Ser-Arg-His-Lys-Argなるアミノ酸配列を有するペプチドを採用した。

【0031】次に本発明者等は、このようにして設計したキメラタンパク質βGal-117KS4HRHPH34を大腸菌で発現させ、封入体として洗浄回収後可溶化し、分泌型Kex2誘導体反応に供したのち精製方法を検討した。大腸菌由来不純物、未反応キメラタンパク質や保護ペプチドを含むペプチドは、中性から弱酸性で溶解性が極端に低下することを利用して、pHを分泌型Kex2誘導体反応至適pHの7.8~8.2から6.2~6.5へシフトすることで沈殿させることができた。

【0032】さらに、変性剤(尿素)濃度を希釈により低下させることでほとんどの不純物を沈殿させ得た。遠心分離または圧搾濾過により沈殿を除去し、hPTH(1-34)を効率よく上清に回収した。上清をpH5.0に調整後陽イオン交換クロマト(例えば、PorosHS、SPトヨパール)にhPTH(1-34)を吸着させ、0.3M~0.4MのNaClで溶出させた。溶出液に酢酸を添加し、低圧逆相クロマト(例えば、PorosR2、SokenODS-W)にhPTH(1-34)を吸着させ、30%程度のアセトニトリルで溶出させ、濃縮及び逆相HPLCに悪影響を与える不純物の除去を行った。

【0033】溶出液中のアセトニトリルを減圧蒸留で除き、0.22μmのフィルターで濾過し、逆相HPLC(例えば、InertsilPrepODS、TSK-ODS-120T)にhPTH(1-34)を吸着させ、アセトニトリルのグラジエント溶出にて分画し、高純度の画分を集め、純度99.5%のhPTH(1-34)を回収率40%~70%で分取した。以上の結果から、この回収率は今まで報告されている中で最も高く、本発明の有用性が実証された。

【0034】

【実施例】実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。以下本発明のための材料として用いたプラスミド、大腸菌、各実施例に共通な基本的な実験操作について述べる。

【0035】プラスミド

プラスミドpG210ShCT[G]は、β-ガラクトシダーゼのN末端1位から210位までのアミノ酸からなるペプチドのうち、76位、122位及び154位のシステイン残基がセリン残基に置換されているもの(βGal-210S)にグルタミン酸残基を介して、hCT[G](ヒトカルシトニンの32位のアミノ酸のC末端にグリシン残基が付加したペプチド)が結合したキメラタンパク質を大腸菌ラクトースオペロンのプロモーター(lacプロモーター)により発現できるプラスミドである。

【0036】pGHα210(Ser)rop⁻を制限酵素PvuIIとEcoRIで消化して得られるβGal-210Sの一部をコードする遺伝子を含むDNAフラグメントとpG97S4DhCT[G]を制限酵素PvuIIとEcoRIで消化して得られるベクター部分を含むDNAフラグメントと連結して作製した(図13)。なお、pGHα210(Ser)rop⁻の作製方法については特公平6-87788に開示され、プラスミドpG97S4DhCT[G]を含有する大腸菌W3110株は、Escherichia coli SBM323と命名し、工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号：微工研条寄第3503号(FERM BP-3503)として1991年8月8日に寄託されている。

【0037】プラスミドpG210ShCT[G]に目的とするペプチドをコードするDNA領域を読み枠を合わせてEcoRI-SalI DNAフラグメントとして導入すれば、βGal-210Sとのキメラタンパク質を発現することができる。合成ヒト副甲状腺ホルモン前駆体(hPrPTH(1-84))遺伝子のクローニングおよびプラスミドpGP#19の作製の材料として用いた(図3)。

【0038】大腸菌

大腸菌JM109株はコンピテントセルの状態で東洋紡(株)から購入し、プラスミドの調製に利用した。大腸菌M25株(W3110/ompT:Sugimura et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 153, 753-759, 1988)は、キメラタンパク質の発現に利用した。

【0039】培地

大腸菌の培養には以下の培地を用いた。

SB培地：0.5% (w/v) グリセロール、2.4% (w/v) 酵母エキス、1.2% (w/v) トリプトン、0.1Mリン酸水素カリウム緩衝液(pH7.5)
 NU1合成培地：0.4% (w/v) 酵母エキス、0.4% (w/v) K₂HPO₄、0.4% (w/v) KH₂PO₄、0.27% (w/v) Na₂HPO₄、1.

11

2% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.02% (w/v) NH_4Cl 、0.3% (w/v) L-メチオニン、0.2% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、40mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、40mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、10mg/L $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、10mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.5mg/L H_3BO_3 および10mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 。

【0040】基本的な実験操作

具体的に実施例に示さない場合は、実験操作は以下の方法に従った。DNAプライマーは、フォスホアミダイド法による全自動合成機（アプライドバイオシステムズモデル320A）で合成した。DNA塩基配列はジデオキシ法で決定した。DNA切断は購入先の指定する3~10倍量の制限酵素を用いて1時間反応させた。プラスミド構造の解析は0.5~1 μg のDNAを用いて20 μl 反応液中で行い、DNAの調製には3~10 μg のDNAを用いて50~100 μl 反応液中で行った。反応温度、反応バッファー等の条件は購入先の指定に従った。

【0041】アガロースゲル電気泳動サンプルは、反応液に1/5容量の色素液（0.25% (w/v) ブロムフェノールブルーを含む15% (w/v) Ficoll水溶液）を加え調製した。アガロースゲル電気泳動用バッファーにはTAEバッファー（40mM Tris/酢酸、2mM EDTA）を用いた。プラスミドの構造解析にはMupid-2（コスモバイオ（株））を用いて100ボルト1時間の泳動を行ない、DNAの調製のためには水平ゲル（20cm x 15cm x 0.7cm）を用いて150ボルト4時間または35ボルト13時間の泳動を行った。ゲルはエチジウムブロミド水溶液（0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で20分染色した後、紫外線照射してDNAバンドを検出した。アガロースゲル濃度は、分画するDNAフラグメントの大きさに合わせて、1.0、2.0% (w/v) を用いた。

【0042】アガロースゲル中のDNAは、0.1 \times TAEバッファーを満たした透析チューブ内にゲルを入れ電圧をかけて溶出させ、ゲルから抽出した。DNA溶液をフェノール処理、クロロホルム処理後、エタノール沈殿を行い、DNAを精製した。ライゲーション反応は、0.05~1 μg のDNAフラグメントを含む反応液（67mM Tris/HCl (pH7.5)、5mM MgCl_2 、5mM DTT、1mM ATP）30 μl に10単位のT4 DNAライゲースを加え、16 $^{\circ}\text{C}$ で12~18時間反応を行うか、TAKARA ligation Kit（宝酒造（株））を用いて行なった。

【0043】大腸菌JM109株の形質転換法は購入先の指示に従い、大腸菌M25株の形質転換法は塩化カルシウム法に準じて行い、形質転換株は薬剤耐性（テトラ

12

サイクリン）で選択した。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）サンプルは、同量のSDSサンプルバッファー（63mM Tris/HCl (pH6.8)、10% (w/v) グリセロール、10% (w/v) SDS、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ブロムフェノールブルー）を加え、3分間煮沸し調製した。電気泳動は、16% (w/v) SDSPAGEmini (TEFCO) ゲルを用いて1枚あたり20mAで70分間行い、ゲルはクマジーブリリアントブルーGで染色した。

10 【0044】hPTH（1-34）の定量は、まず、hPTH（1-34）を含む溶液をサンプルバッファー（1M酢酸/2M尿素）で10倍から20倍に希釈後、遠心上清を得、次に、これをYMC-ODS-A302（d4.6mmX150mm）カラム（（株）山村化学研究所）を接続したHPLC島津製作所（株）LC10A）に供し、A液（0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸（TFA）/10% (v/v) アセトニトリル）、B液（0.094% (v/v) TFA/50% (v/v) アセトニトリル）、B40%→80%/20min勾配の系にて展開し、214nmの吸光度測定にて検出されたhPTH（1-34）のピーク面積を既知濃度の標準hPTH（1-34）のピーク面積と比較し行なった。その他、別途表示する以外は基本的な遺伝子操作はMolecular Cloning（Maniatisら編、Cold Spring Harbor laboratory、New York（1982））に記載の方法に従って行なった。

【0045】実施例1. hPr oPTH（1-84）遺伝子の作製

30 hPr oPTH（1-84）遺伝子は、図1に示すようにU1~U7（配列番号1~7）およびL1~L7（配列番号8~14）の14本のフラグメントに分け、合成した。hPr oPTH（1-84）遺伝子は、各フラグメントを以下のように連結し、作製した（図2）。

40 【0046】まず、DNAフラグメントU1（配列番号1）とL7（配列番号14）（各々約1 μg ）を16単位のT4ポリヌクレオチドカイネースと0.5nM（1MBq以上）の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ を含むリン酸化反応液15 μl 中（50mM Tris/HCl (pH7.6)、10mM MgCl_2 、5mM DTT）で37 $^{\circ}\text{C}$ 、15分間反応させた。これに5mM ATPを含むリン酸化反応液5 μl を加え、さらに37 $^{\circ}\text{C}$ で45分間反応させた。U2（配列番号2）とL6（配列番号13）、U3（配列番号3）とL5（配列番号12）、U4（配列番号4）とL4（配列番号11）、U5（配列番号5）とL3（配列番号10）、U6（配列番号6）とL2（配列番号9）、およびU7（配列番号7）とL1（配列番号8）についても同様に行なった。

50 【0047】上述の7個の反応液をひとつにまとめ、エタノール沈殿を行いDNAを回収した。これを80 μl の100mM Tris/HCl (pH7.6)、6.

5mM MgCl₂、300mM NaClに溶解した。このうち40μlを95℃に5分間放置した後、30分かけて43℃まで温度を下げた。氷冷後40μlのライゲーションB液(宝酒造(株))を加え、26℃に15分放置した。このサンプルを5%ポリアクリルアミド電気泳動に供した。泳動後、オートラジオグラフィで、連結したDNAフラグメントを検出した。約280bpに対応するDNAフラグメントをゲルから抽出後、定法に従い精製した。

【0048】実施例2. βGal-139S (FM) PPH84発現プラスミドpGP#19の作製

合成hProPTH(1-84)遺伝子を含む約280bpのDNAフラグメントには、5'末端には制限酵素EcoRI部位が3'末端には制限酵素SalI部位が存在する。hProPTH(1-84)遺伝子のクローニングはこのEcoRI/SalI DNAフラグメントをpG210ShCT[G]のEcoRI/SalI部位に挿入し、行った。

【0049】pG210ShCT[G]を制限酵素EcoRIとSalIで切断後、ベクター部分を含む約3.5kb DNAフラグメントを調製した。これと実施例1で得られた約280bpからなるhProPTH(1-84)遺伝子のDNAフラグメントを連結し、プラスミドpG210ShProPTHを得た(図3)。pG210ShProPTHを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、JM109[pG210ShProPTH]を得た。さらに、pG210ShProPTHの制限酵素XhoI/EcoRI部位にリンカーKM091(配列番号15)、及びKM092(配列番号16)を導入し、プラスミドpG210S(S/X)を作製した(図3)。なお、このリンカーは、両端に制限酵素XhoIとEcoRI部位を、その間にSacI部位を持つ。

【0050】pG210S(S/X)は、制限酵素SacIおよびXhoIで消化後、Kilo-Sequence用 Deletion Kit(宝酒造(株))を用いて、βGal-210SをコードするDNA領域を経時的かつ特異的に欠失させた。Klenowフラグメントで末端修復をおこなったのち、セルフライゲーションを行ない、βGal-139SとhProPTH(1-84)がPhe-Metを介して連結されたキメラタンパク質βGal-139S(FM)PPH84をコードするプラスミドpGP#19を得た(図4)。pGP#19を導入した大腸菌JM109株をJM109[pGP#19]と呼ぶ。

【0051】実施例3. βGal-117SmHPPH34発現プラスミドpG117SmHPPH34の作製
本実施例においては、βGal-117SmHPPH34発現プラスミドpG117SmHPPH34の作製を例に挙げるが、βGal-117Sに変えてβGal-

97SあるいはβGal-139Sを用いることにより、βGal-97SmHPPH34発現プラスミドpG97SmHPPH34あるいはβGal-139SmHPPH34発現プラスミドpG139SmHPPH34を作製することができる。

【0052】1) pGP#19PPH34の作製
pGP#19PPH34は、pGP#19を鋳型にS01(配列番号17)およびS02(配列番号18)をプライマーとして、PCR法により、hPTH(1-84)の35位のバリン残基のコードGTTを翻訳停止コードTAAに変換したDNAフラグメントを増幅後、常法により制限酵素AatII-SalI DNAフラグメントを単離精製し、pGP#19の対応する部分と交換して作製した(図5)。

【0053】2) pG117SPPH34の作製
pG210(S/X)を鋳型にS03(配列番号19)とS05(配列番号20)をプライマーとしてPCR法により増幅後、制限酵素PvuIとSmaIで消化したDNAフラグメント、pGP#19PPH34を鋳型にS07(配列番号21)およびS02をプライマーとしてPCR法により増幅後、制限酵素SalIとSmaIで消化したDNAフラグメント、並びにpGP#19PPH34の複製開始点を含む制限酵素PvuI-SalI DNAフラグメントをT4ライゲースで連結し、pG117SPPH34を作製した(図6~7)。

【0054】3) pG117SmHPPH34(m=4又は8)の作製

pG117SmHPPH34(m=4又は8)は、pG117SPPH34の制限酵素SmaI部位に(His)₄-Pro-GlyをコードするリンカーS08(配列番号22)とS09(配列番号23)、および{(His)₄-Pro-Gly}₂をコードするリンカーS10(配列番号24)とS11(配列番号25)を挿入し作製した。なお、リンカーの長さを変えることにより、m=12、16又は24であるプラスミドを作ることができる(図6~7)。

【0055】さらに、pG117SPPH34の制限酵素SmaI部位に(Lys)₄-Pro-GlyをコードするリンカーS12(配列番号26)とS13(配列番号27)を挿入し、pG117S4KPPH34を作製した。同様にして、pG97S4KPPH34、pG139S4KPPH34を作製することができる。また、挿入されたリンカーの数および方向は、プラスミドを調製後、DNA塩基配列を決定し、確認し、本実施例において作製したキメラタンパク質を表1に示した。

【0056】

【表1】

表 1

	β Gal-97SmHPPH34	β Gal-117SmHPPH34	β Gal-139SmHPPH34
-	○	○	○
4H	○	○	
8H	○	○	○
12H	○	○	○
16H		○	
24H		○	
4K	○	○	○

表中、Hはヒスチジン残基を、Kはリジン残基を示し、数字は、各アミノ酸の数を示す。

【0057】実施例4. hPTH (1-34) キメラタンパク質の生産

表1に示したキメラタンパク質の生産性をSDS-PAGEを用いて調べた。表1に示したキメラタンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミド16個をそれぞれ大腸菌JM109株に導入し、2mlのSB培地で37℃16時間試験管で振盪培養後、生理食塩水にて希釈し、培養液濁度(OD660)を1.0とした。この懸濁液100 μ lに同量のSDSサンプルバッファーを加え、3分間煮沸し、その上清10 μ lを用いてSDS-PAGEを行い、各菌体あたりのキメラタンパク質生産量を比較した。

【0058】結果を図8に示す。その結果、 β -ガラクトシダーゼ誘導体とヒスチジン残基の数の組み合わせにより発現量が変化し、 β Gal-97Sでは、{(His)₄-Pro-Gly}_nにおいてn=2、3、 β Gal-117Sでは、n=1、2、3、4、6、 β Gal-139Sでは、n=2、3で高生産性を獲得したことがわかった。特に β Gal-117Sの誘導体においては{(His)₄-Pro-Gly}_n (n=1~6)の導入により発現量が顕著に増加し、これらの生産量はリジン残基によって単に電荷を変えたものより多かった。

【0059】実施例5. キメラタンパク質からのhPTH (1-34) 切り出し

高生産量のキメラタンパク質(β Gal-97SmHPPH34 (m=12)、 β Gal-117SmHPPH34 (m=0、4、8、12、16、24)、 β Gal-139SmHPPH34 (m=0、12) ; m=0はコントロール)について、Kex2-660の基質としての適性を調べるため、キメラタンパク質封入体を回収し、8M尿素で溶解後反応液組成(20mMTri s / HCl (pH8.2)、100mM NaCl、3.0M尿素、2.0mM CaCl₂、8mg/mlキメラ

タンパク質)になるように希釈し、Kex2-660を終濃度20kU/mlとなるように添加して、hPTH (1-34)の切り出しを行った。本条件下、1時間でコントロールの β Gal-117SPPH34は90%以上切断された。

【0060】各誘導体のKex2-660反応性は、pG117SPPH34のkcatとの比をもって図9に示した。hPTH (1-34)の定量は[基本的な実験操作]に示した方法で行った。この結果、実施したすべての例で{(His)₄-Pro-Gly}_n (n=1~6)の導入によりKex2-660反応性も改善されることがわかった。特に、 β Gal-117S4HPPH34は、1個の(His)₄-Pro-Glyリンカーの挿入で、キメラタンパク質の生産量とKex2-660反応性が改善され、さらにKex2反応条件下での溶解度も15g/L以上で β Gal-139SPPH34の8g/Lに比べて改善されていることがわかった。

【0061】実施例6. hPTH (1-34) の大量生産

高発現かつKex2-660の基質としても適していたキメラタンパク質 β Gal-117S4HPPH34を大量に得るため、本キメラタンパク質をコードする遺伝子を有するプラスミドpG117S4HPPH34で大腸菌M25株(W3110/ompI)を形質転換し、M25[pG117S4HPPH34]株を得た。M25[pG117S4HPPH34]株は、2% (w/v) 酵母エキス、1% (w/v) トリプトン、1.2% (w/v) K₂HPO₄、0.3% (w/v) KH₂PO₄、0.5% (w/v) グリセロールからなる培地を用い、20L培養槽にて37℃で培養した。

【0062】菌体濃度がOD660=1.0のときにIPTG (イソプロピルベータチオガラクトシド)を最終濃度1mMとなるように添加し、菌体濃度がOD660=1.2まで培養を継続した。集菌後、TE (10mMT

17

ris/HCl、1mM EDTA (pH8.0))に懸濁し、高圧ホモジナイザー (Manton-Gaulin) による菌体破碎、遠心分離、TEおよび脱イオン水での懸濁洗浄を行って、封入体約100gを得た。封入体懸濁液 (160g/L) 250mlに、1M Tris/HCl (pH8.2) 100ml、5M NaCl 50ml、脱イオン水500ml、尿素900gを加えて30℃の恒温槽中30分搅拌溶解し、暖めた脱イオン水で希釈し、30℃で5Lとした。

【0063】これに250mM CaCl₂ 溶液50mlを搅拌しながら穏やかに添加し、さらにKex2-660を20kU/mlとなるように加えた。2時間後、(切断率は90%以上) 酢酸にてpHを6.4に合わせ、さらに脱イオン水で2倍に希釈し、未反応キメラタンパク質および保護ペプチドを凝集沈殿させた。遠心分離によりhPTH (1-34)を含む上清を得、酢酸にてpHを5.0とし、10mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で平衡化した陽イオン交換樹脂 (SPトヨパール) カラムを通してhPTH (1-34) を吸着さ*

表 2

hPTH (1-34) の回収率

工 程 名	PTH量 (g)	回収率 (%)
Kex2-660反応	7.0	100
酸沈殿上清	6.7	95
陽イオン交換カラム	6.0	85
低圧逆相カラム	5.8	82
HPLC	4.0	57

【0066】実施例7. キメラタンパク質のKex2-660認識部位P3のアミノ酸置換

P3部位のアミノ酸 (Lys) を他のアミノ酸に変換するため、P3部位に対応するコドンを変換したオリゴヌクレオチドS14~S18 (配列番号28~32) を合成し、これらとS02 (配列番号18) をプライマーに、pG117S4HPPH34を鋳型として、PCR法にてDNAフラグメントを合成した。該DNAフラグメントを、エタノール沈殿法にて精製し、Stu IおよびSal Iで切断後、2.0% (w/v) アガロース電気泳動を行い、目的とする0.4kbpのStu I-Sal Iフラグメントを精製した。

【0067】次に該DNAフラグメントと、Stu IおよびSal Iで消化し同様に精製したpG117S4HPPH34のβガラクトシダーゼ部分をコードするDNAフラグメントとをライゲーション反応に供した。反応後、大腸菌JM109株を形質転換し、テトラサイクリン耐性株を取得した。各組み合わせ毎に形質転換体を10個選択し、培養後、プラスミドを調製し、変異導入部分の

18

*せ、0.4M NaClで、hPTH (1-34) を溶出させた。

【0064】これに酢酸を最終3% (v/v) となるように添加し、3% (v/v) 酢酸で平衡化した低圧逆相カラム (SokenODS-W) を通してhPTH (1-34) を吸着させ、3% (v/v) 酢酸を含む30% (v/v) アセトニトリル溶液でhPTH (1-34) を溶出させた。減圧下でアセトニトリルを除き、0.22μmのメンブレンフィルターでろ過して、逆相HPLC分取カラム (TSKgelODS120T Φ55X600) にて精製した。溶出は、アセトニトリルの直線濃度勾配 (A: 5% (v/v) 酢酸/10% (v/v) アセトニトリル; B: 5% (v/v) 酢酸/40% (v/v) アセトニトリル; %B=20%→80%/60分、流速40ml/分) で溶出した。各工程でのhPTH (1-34) 回収率を表2に示した。

【0065】

【表2】

DNA塩基配列を決定、P3部位アミノ酸が以下のアミノ酸に置換した遺伝子を含むプラスミドを持つクローンを選択した。

【0068】すなわち、pG117S4HPPH34のコードするキメラタンパク質のKex2-660認識部位Ser-Val-Lys-Lys-ArgがSer-Val-X-Lys-Arg (X=Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln, Lys, Arg, Phe, Tyr, Trp, His, Pro) に置換されたアミノ酸配列を持つキメラタンパク質βGal-117S4HVXPH34の発現ベクターpG117S4HVXPH34を得た。

【0069】各キメラタンパク質とKex2-660反応性を調べるため、各クローンを50mlのSB培地で培養し、菌体濃度がOD660=1.0の時にIPTGにて発現を誘導後、さらに4時間培養を続け、集菌、TE緩衝液洗浄、懸濁、破碎、遠心分離を行い、封入体を得た。さらに各封入体を1% (w/v) Triton X

100、10mM EDTAおよびTEで洗浄し、精製した封入体を得た。該封入体に含まれるペプチド成分の90%以上が目的とするキメラタンパク質であった。各キメラタンパク質の封入体懸濁液に、1M Tris/HCl (pH8.2) 20 μ l、5M NaCl 20 μ l、10M尿素300 μ lを加えて溶解し、脱イオン水650 μ lで希釈後、30℃の恒温槽中で10分保温し、これに250mM CaCl₂溶液10 μ lを添加し、さらにKex2-660を20kU/mlとなるように加えた。

【0070】本条件下、1時間でコントロールの β Gal-117SPPH34は90%以上切断された。hPTH(1-34)の生成は、前述のODSカラムを用いたHPLCで定量した。各誘導体のKex2-660反応性は、pG117S4HPPH34のkcatとの比をもって示した(図10)。X=Phe、Hisのときには、Kex2-660によるhPTH(1-34)の切り出し効率が良くなり、X=ProではKex2-660によりhPTH(1-34)がほとんど切り出されないことが明らかになった。

【0071】実施例8. キメラタンパク質のKex2-660認識部位P4のアミノ酸置換

実施例7の結果および、切断時の副生成物の少ないことから、P3部位にヒスチジン残基を持つキメラタンパク質 β Gal-117S4HVHPH34をhPTH(1-34)生産のためのキメラタンパク質として選び、P4部位のアミノ酸置換によるKex2-660反応性のさらなる向上を試みた。オリゴヌクレオチドS19~S24(配列番号33~38)を合成し、これらとS02をプライマーとし、pG117S4HVHPPH34を

【0072】実施例7に示した方法で、キメラタンパク質のKex2-660認識部位Ser-Val-His-Lys-ArgがSer-X-His-Lys-Arg(X=Gly、Ala、Leu、Ile、Ser、Thr、Asp、Glu、Asn、Gln、Lys、Arg、Cys、Met、Phe、Tyr、Trp、His、Pro、Val)に置換された構造を持つキメラタンパク質 β Gal-117S4HXHPPH34の発現ベクターpG117S4HXHPPH34が得られた。

【0073】該キメラタンパク質を基質として実施例6と同じ条件でKex2-660に対する感受性を判断した。X=Lys、Argのときには、Kex2-660によるhPTH(1-34)の切り出し効率が良くなり、Xが酸性アミノ酸(Asp、Glu)の時にはKex2-660によりhPTH(1-34)がほとんど切り出されないことが明らかになった(図11)。これにより、Kex2-660プロテアーゼは、P1部位にアルギニン残基、P2部位に強塩基性アミノ酸又はプロリ

ン残基を要求するだけでなく、P3部位にヒスチジン残基又はフェニルアラニン残基、P4部位に強塩基性アミノ酸を好むことおよび、P3部位にプロリン残基が、またはP4部位に酸性アミノ酸があると該キメラタンパク質切断活性が極端に低下することが初めて明らかになった。

【0074】実施例9. 保護ペプチドのKex2-660切断部位の除去

実施例7及び8におけるKex2-660切断反応を経時的にHPLCにて追跡した結果、保護ペプチド β Gal-117Sの13、14位のArg-Arg配列のC末端側のペプチド結合が切断されることが判明した。これにより、生じる β Gal(1-14)は、hPTH(1-34)を酸性沈殿により精製する時に混入することが予想された。そこで、14位のArgをLysに置換し、Kex2-660による切断を抑制し、 β Gal(1-14)の生成を抑えることを試みた。

【0075】14位のArgをLysに置換したキメラタンパク質(β Gal-117KS4HRHPH34)をコードするプラスミドpGKSPH34(図12)を以下のように作製した。まず、オリゴヌクレオチドS25(配列番号39)とS26(配列番号40)をプライマーとし、pG117S4HRHPH34を鋳型として、PCR法にて変異が導入されたDNAフラグメント、AseI-RKを合成した。同様にオリゴヌクレオチドS27(配列番号41)とS28(配列番号42)をプライマーとし、DNAフラグメント、RK-BglIIを合成した。

【0076】各DNAフラグメントを精製し、各々約1ngずつを混合し、プライマー非存在下でPCRを4回を行い、変異が導入された、AseI-BglIIフラグメントを合成した。これに再度オリゴヌクレオチドS25とS28を添加してPCRを継続し、同フラグメントを増幅した。本フラグメントをエタノール沈殿法にて精製し、AseIおよびBglIIで切断後、2.0%(w/v)アガロース電気泳動を行い、目的とする0.35kbpのフラグメントを調製した。pG117S4HRHPH34のAseI/SphI(1.8kbp)フラグメントおよびSphI/BglII(1.4kbp)フラグメントを、1.0%(w/v)アガロース電気泳動を行い、精製した。

【0077】上記3フラグメントをライゲーション反応後、大腸菌JM109を形質転換し、テトラサイクリン耐性株を取得し、プラスミドをアルカリ法にて調製後、変異導入部分のDNA塩基配列を解析し、保護ペプチド14位のArgをコードするDNA配列CGGをAAGに置換した遺伝子を含むプラスミドpGKSPH34を持つ目的クローンを選択した。実施例5に示した方法で、キメラタンパク質の封入体を取得し、Kex2-660反応に供した結果、この置換によりほぼ完全に保護ペプチドの切断が抑制され、精製工程の負担を軽減でき

ることが判明した。

【0078】実施例10. キメラタンパク質βGal-117KS4HRHPH34の大量調製とhPTH(1-34)の生産

試験管レベルでKex2-660の基質として最適と考えられたキメラタンパク質βGal-117KS4HRHPH34の大量培養条件下における生産性とKex2-660プロテアーゼによる切り出し、およびhPTH(1-34)の精製を行った。pGKSPH34にて、大腸菌M25株を形質転換し、テトラサイクリン耐性株を取得し、生産株M25[pGKSPH34]を作製した。M25[pGKSPH34]株を2%(w/v)グルコースを含むNU1合成培地にて大量培養を行った。

【0079】グルコース消費後は、炭素源としてグリセロールをフィードし、pHを7.0にコントロールしながら、24時間培養を行った。最終到達菌体濃度は、150-200ODであった。該キメラタンパク質は、大量培養条件下でも安定した生産性を示し、大量発現にも関わらず、顕著な宿主大腸菌の生育阻害は見られなかった。封入体生産量は約5g/L培地であった。菌体破碎後の不溶性画分をTEおよび脱イオン水で洗浄して精製封入体を得た。

【0080】尿素で可溶化した後希釈して、反応液組成を20mM Tris/HCl(pH8.2)、50mM NaCl、2.5mM CaCl₂、2.7M尿素、8.0mg/mlキメラタンパク質とし、反応温度30℃でKex2-660を5kU/mlになるように添加し、キメラタンパク質からhPTH(1-34)の切り出しを行い、hPTH(1-34)の生成を定量した。30分で切断率90%以上となり、βGal-117S4HHPH34と比較して、Kex2-660量が1/4に減少した。反応終了後、実施例5と同様にhPTH(1-34)精製した。精製工程の回収率は実施例5の場合とほぼ同様であった。

実施例11. βGal-117S4HGP生産プラスミド、pG117S4HGPの作製

グルカゴン様ペプチドI(hGLP-1(7-37))を含むキメラタンパク質(βGal-117S4HGP)を生産するプラスミド、pG117S4HGPは以下の手順で作製した。まず、図14(a)に示す4つのDNA(GLP-1(配列番号:43)、GLP-2(配列番号:44)、GLP-3(配列番号:45)、GLP-4(配列番号:46))を合成し、それらの5'末端をT4ポリヌクレオチドカインースを用いてリン酸化後、これらを混合し、アニーリングさせて、hGLP-1(7-37)遺伝子(DNA(I))を調製した。一方、図14(b)に示す2つの合成DNA(117S4H Sph Iプライマー(配列番号:47)、117S4H Bgl IIプライマー(配列番号:48))はPCRプライマーとして使用し、pGKSPH34を鋳型として

PCRを行った。得られたPCR産物は、Bgl IIおよびSph Iで消化し、Bgl IIおよびSph Iの粘着末端を持つDNA断片(DNA(II))を調製した。

【0081】次に、pGKSPH34をBgl IIおよびSph Iで消化後、1%アガロース電気泳動を行い、大きい方のDNA断片(DNA(III))をゲルより回収した。このようにして得られたDNA(I)、DNA(II)およびDNA(III)をT4DNAリガーゼを用いて連結し、pG117S4HGPを作製した(図15)。

10 【0082】実施例12. キメラタンパク質βGal-117S4HGPの生産

作製したpG117S4HGPを有する大腸菌W3110M25株を、1.5%グルコース、4g/L K₂HPO₄、4g/L KH₂PO₄、2.7g/L Na₂HPO₄、0.2g/L NH₄Cl、1.2g/L (NH₄)₂SO₄、4g/L 酵母エキス、2g/L L-メチオニン、2g/L MgSO₄・7H₂O、40mg/L CaCl₂・2H₂O、40mg/L FeSO₄・7H₂O、10mg/L MnSO₄・nH₂O、10mg/L AlCl₃・H₂O、4mg/L CoCl₂・6H₂O、2mg/L ZnSO₄・7H₂O、2mg/L Na₂MoO₄・2H₂O、1mg/L CuCl₂・2H₂O、0.5mg/L H₃BO₃、10mg/L テトラサイクリンを含む培地で、32℃、pH7.0で培養し、グルコースの枯渇後は、グリセリンを炭素源として、37℃でさらに8時間培養し、菌体内にβGal-117S4HGPの封入体を生産させた。

【0083】培養終了後、培養液をマントンゴリンホモジナイザー(マントンゴリン社製、モデル15M-8TA)により600KG/cm²の条件でホモジナイズ処理し、遠心分離(CEPA遠心分離機)により沈殿画分を回収した。得られた沈殿を培養液と等量の緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mMEDTA)に懸濁後、再度、遠心分離で沈殿を回収し、培養液と等量の脱イオン水に懸濁した。その後、再び遠心分離を行い沈殿を回収した後、沈殿と等容量の脱イオン水に懸濁し、後の操作に使用した。

40 【0084】実施例13. キメラタンパク質からのhGLP-1(7-37)の切り出し

実施例12で得られたキメラタンパク質封入体を回収し、8M尿素で溶解後反応液組成(20mM Tris-HCl(pH8.2)、100mM NaCl、3.0M尿素、2.0mM CaCl₂、8mg/mlキメラタンパク質)になるように希釈し、Kex2-660を10,000U/mlとなるように添加して、hGLP-1(7-37)の切り出しを行った。本条件下、一時間でコントロールのβGal-117S4HGPは90%以上切断された。

50 【0085】実施例14. hGLP-1(7-37)の

分取 (図16、表3)

高発現かつKex2-660の基質としても適していたキメラタンパク質 β Gal-117S4HGPを大量に得るため、本キメラタンパク質をコードするプラスミドpG117S4HGPにて大腸菌M25 (W3110/ompT) を形質転換し、20L培養槽にて培養した。培地は酵母エキス20g/L、バクトトリプトン10g/L、 K_2HPO_4 12g/L、 KH_2PO_4 3g/L、グリセリン5g/Lからなり、菌体濃度がOD660=1.0で、IPTG (イソプロピルベータチオガラクトシド) を最終濃度1mMとなるように添加した。消泡剤 (デイスフォームCC-222、(株) 日本油脂) を用いた。

【0086】37℃で菌体濃度がOD660=1.2まで培養を継続した。集菌後、TE (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA pH8.0) に懸濁し、高圧ホモジナイザー (Manton-Gaulline) による菌体破碎、遠心分離、TE及び脱イオン水での懸濁洗浄を行って、封入体約100gを得た。封入体懸濁液 (160g/L) 250mlに、1M Tris/HCl (pH8.2) 100ml、5モル NaCl溶液 50ml、脱イオン水500ml、尿素900gを加えて30℃の恒温槽中30分攪拌溶解し、暖めた脱イオン水で希釈し、30℃で5Lとした。これに250mM $CaCl_2$ 溶液50mlを攪拌しながら穏やかに添加し、更にKex2-660を20,000unit/ml (約4,0mg/L) となるように加えた。

【0087】2時間後、(切断率は90%以上) 酢酸にてpHを6.4に合わせ、更に脱イオン水で2倍に希釈し、未反応キメラタンパク質及び、保護ペプチドを凝集沈殿させた。遠心分離によりhGLP-1 (7-37) を含む上清を得、酢酸にてpHを5.0とし、2M尿素*

*・10mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で平衡化した陽イオン交換樹脂 (SPトヨパール) カラムを通してhGLP-1 (7-37) を吸着させ、2M尿素・10mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.2) で洗浄後、0Mから300mMまでの塩化ナトリウム濃度勾配にて、hGLP-1 (7-37) を溶出させた。あらかじめフラクションチューブには、最終3%となるように酢酸を入れておき、hGLP-1 (7-37) の凝集を抑制した。

10 【0088】hGLP-1 (7-37) を含む画分を集め、5%酢酸で平衡化した低圧逆相カラム (Soken ODS-W) を通してhGLP-1 (7-37) を吸着させ、5%酢酸を含む50%アセトニトリル溶液で、hGLP-1 (7-37) を溶出させた。減圧下でアセトニトリルを除き、0.22 μ mのメンブレンフィルター濾過後、凍結乾燥した。

【0089】hGLP-1 (7-37) の定量を以下詳述する。hGLP-1 (7-37) を含む溶液をサンプルバッファー (1M酢酸/2M尿素) で10倍から2020倍に希釈し、遠心上清を得る。HPLC (島津LC10A) にYMC-C8-A302 (4.6mm I.D. \times 150mm) カラムを接続し、A液 (0.1% TFA/10%アセトニトリル)、B液 (0.094% TFA/60%アセトニトリル)、B40%→80%/20min勾配の系にて該上清の10 μ lないしは20 μ lを展開し、220nmの吸光度測定にて検出されたhGLP-1 (7-37) と既知濃度の標準hGLP-1 (7-37) のピーク面積比から定量する。回収率を表3に示す。

30 【0090】

【表3】

表 3

hGLP-1 (7-37) 回収率

工程名	容積/[l]	hGLP-1/[g]	回収率/[%]
Kex2-660 反応	4.0	4.8	100
酸沈殿上清	7.8	3.3	68
陽イオン交換カラム	0.5	2.8	60
低圧逆相カラム		2.0	40

【0091】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 40

配列

AATTCATGAA ATCTGTTAAA AAGCGTTCTG TTTCTGAAAT

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

25

【0092】配列番号：2

配列の長さ：41

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

配列

TCAGCTGATG CATAACCTGG GCAAACACCT GAATAGCATG G

41

【0093】配列番号：3

配列の長さ：41

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

配列

AACGCGTCGA GTGGCTGCGT AAGAAACTGC AGGACGTCCA C

41

【0094】配列番号：4

配列の長さ：41

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

配列

AACTTCGTTG CGCTGGGTGC ACCGCTGGCT CCACGTGATG C

41

【0095】配列番号：5

配列の長さ：39

配列の型：核酸

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

AGGATCCCAA CGTCCGCGTA AGAAAGAAGA TAACGTACT

39

【0096】配列番号：6

配列の長さ：40

配列の型：核酸

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：合成DNA

配列

GGTTGAATCT CATGAGAAAT CCCTGGGCGA AGCTGACAAA

40

【0097】配列番号：7

配列の長さ：40

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

配列

GCCGATGTTA ACGTGCTGAC CAAAGCGAAA AGCCAGTAAG

40

【0098】配列番号：8

配列の長さ：33

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

配列

TCGACTTACT GGCTTTTCGC TTTGGTCAGC ACG

33

【0099】配列番号：9

配列の長さ：40

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

配列

TTAACATCGG CTTTGTGAGC TTCGCCAGG GATTTCAT

40

【0100】配列番号：10

配列の長さ：40

配列の型：核酸

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

GAGATTCAAC CAGTACGTTA TCTTCTTCT TACGCGGACG

40

【0101】配列番号：11

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTGGGATCCT GCATCACGTG GAGCCAGCGG TGCACCCAGC G

41

26

<p>27</p> <p>【0102】配列番号：12</p> <p>配列の長さ：41</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>*鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>* 配列の種類：合成DNA</p>	28
<p>配列</p> <p>CAACGAAGTT GTGGACGTCC TGCAGTTTCT TACGCAGCCA C</p>		41
<p>【0103】配列番号：13</p> <p>配列の長さ：41</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>※鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>※ 配列の種類：合成DNA</p>	
<p>配列</p> <p>TCGACGCGTT CCATGCTATT CAGGTGTTTG CCCAGGTTAT G</p>		41
<p>【0104】配列番号：14</p> <p>配列の長さ：46</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>★鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>★ 配列の種類：合成DNA</p>	
<p>配列</p> <p>CATCAGCTGA ATTTCAGAAA CAGAACGCTT TTTAACAGAT TTCATG</p>		46
<p>【0105】配列番号：15</p> <p>配列の長さ：24</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>☆鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>☆ 配列の種類：合成DNA</p>	
<p>配列</p> <p>TCGAGGTCGA CGGTACCGAG CTCG</p>		24
<p>【0106】配列番号：16</p> <p>配列の長さ：24</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>◆鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>◆ 配列の種類：合成DNA</p>	
<p>配列</p> <p>AATTCGAGCT CGGTACCGTC GACC</p>		24
<p>【0107】配列番号：17</p> <p>配列の長さ：45</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>*鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>* 配列の種類：合成DNA</p>	
<p>配列</p> <p>AAACTGCAGG ACGTCCACAA CTTCTAAGCG CTGGGTGCAC CGCGT</p>		45
<p>【0108】配列番号：18</p> <p>配列の長さ：24</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>※鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>※ 配列の種類：合成DNA</p>	
<p>配列</p> <p>CATTAAAGCT TTGCGATGAT AAGC</p>		24
<p>【0109】配列番号：19</p> <p>配列の長さ：26</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>★鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>★ 配列の種類：合成DNA</p>	
<p>配列</p> <p>CGCACCGATC GCCCTTCCCA ACAGTT</p>		26
<p>【0110】配列番号：20</p> <p>配列の長さ：35</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>☆鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>☆ 配列の種類：合成DNA</p>	
<p>配列</p> <p>TTTCCCGGGC CTCCGTGGGA ACAAACGGCG GATTG</p>		35
<p>【0111】配列番号：21</p> <p>配列の長さ：42</p> <p>配列の型：核酸</p>	<p>鎖の数：一本鎖</p> <p>トポロジー：直鎖状</p> <p>配列の種類：合成DNA</p>	
<p>配列</p> <p>TTTCCCGGGA GGCCTTCTGT TAAAAAGCGG TCTGTTTCTG AA</p>		42

29	<p>【0112】配列番号：22 配列の長さ：18 配列の型：核酸</p>	<p>*鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 * 配列の種類：合成DNA</p>	30
	<p>配列 CACCATCATC ACCCTGGA</p>		18
	<p>【0113】配列番号：23 配列の長さ：18 配列の型：核酸</p>	<p>※鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ※ 配列の種類：合成DNA</p>	
	<p>配列 TCCAGGGTGA TGATGGTG</p>		18
	<p>【0114】配列番号：24 配列の長さ：36 配列の型：核酸</p>	<p>★鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ★ 配列の種類：合成DNA</p>	
	<p>配列 CACCAACATC ATCCTGGACA CCATCATCAC CCTGGA</p>		36
	<p>【0115】配列番号：25 配列の長さ：36 配列の型：核酸</p>	<p>☆鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ☆ 配列の種類：合成DNA</p>	
	<p>配列 TCCAGGGTGA TGATGGTGTC CAGGATGATG GTGGTG</p>		36
	<p>【0116】配列番号：26 配列の長さ：18 配列の型：核酸</p>	<p>◆鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ◆ 配列の種類：合成DNA</p>	
	<p>配列 AAGAAGAAGA AGCCTGGA</p>		18
	<p>【0117】配列番号：27 配列の長さ：18 配列の型：核酸</p>	<p>*鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 * 配列の種類：合成DNA</p>	
	<p>配列 TCCGGACTTC TTCTTCTT</p>		18
	<p>【0118】配列番号：28 配列の長さ：36 配列の型：核酸</p>	<p>※鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ※ 配列の種類：合成DNA</p>	
	<p>配列 GGGAGGCCCTT CTGTTNCAAA GCCTTCTGTT TCTGAA</p>		36
	<p>【0119】配列番号：29 配列の長さ：36 配列の型：核酸</p>	<p>★鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ★ 配列の種類：合成DNA</p>	
	<p>配列 GGGAGGCCCTT CTGTTNATAA GCCTTCTGTT TCTGAA</p>		36
	<p>【0120】配列番号：30 配列の長さ：36 配列の型：核酸</p>	<p>☆鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ☆ 配列の種類：合成DNA</p>	
	<p>配列 GGGAGGCCCTT CTGTTNTTAA GCCTTCTGTT TCTGAA</p>		36
	<p>【0121】配列番号：31 配列の長さ：36 配列の型：核酸</p>	<p>鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成DNA</p>	
	<p>配列 GGGAGGCCCTT CTGTTBGGAA GCCTTCTGTT TCTGAA</p>		36

31

32

【0122】配列番号：32

配列の長さ：36

配列の型：核酸

配列

GGGAGGCCTT CTGTTAAAA GCTTTCTGTT TCTGAA

36

【0123】配列番号：33

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列

GGGAGGCCTT CTADTCATAA GCTTTCTGTT TCT

33

【0124】配列番号：34

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列

GGGAGGCCTT CTAHGCATAA GCTTTCTGTT TCT

33

【0125】配列番号：35

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列

GGGAGGCCTT CTGHGCATAA GCTTTCTGTT TCT

33

【0126】配列番号：36

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列

GGGAGGCCTT CTTKKCATAA GCTTTCTGTT TCT

33

【0127】配列番号：37

配列の長さ：34

配列の型：核酸

配列

GGGAGGCCTT CTCVACATAA GCTTTCTGTT TCTG

34

【0128】配列番号：38

配列の長さ：34

配列の型：核酸

配列

GGGAGGCCTT CTBATCATAA GCTTTCTGTT TCTG

34

【0129】配列番号：39

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

AATTAATGTG AGTTAGCTCA CCATTAG

27

【0130】配列番号：40

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

ATCCCAGTCT TTAGCTTGTA AAAC

24

【0131】配列番号：41

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

GTTTACAAC GTAAAGACTG GGAT

24

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：合成DNA

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

33

【0132】配列番号: 42

配列の長さ: 31

配列の型: 核酸

配列

TTTAGATCTG ACTCCAGCAA GCTGTCCGGC A

【0133】配列番号: 43

配列の長さ: 57

配列の型: 核酸

配列

CGGAAGGTAC CTTTACCAGC GATGTGAGCT CGTATCTGGA AGGTCAGGCG GCAAAAG

【0134】配列番号: 44

配列の長さ: 48

配列の型: 核酸

配列

ACCTTCCAGA TACGAGCTCA CATCGCTGGT AAAGGTACCT TCCGCATG

【0135】配列番号: 45

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸

配列

AATTCATCGC GTGGCTGGTG AAAGGCCGTG GTTAAG

【0136】配列番号: 46

配列の長さ: 53

配列の型: 核酸

配列

TCGACTTAAC CACGGCCCTT CACCAGCCAC GCGATGAATT CTTTGGCGC CTG

【0137】配列番号: 47

配列の長さ: 38

配列の型: 核酸

配列

TGAATTTAG AAGCATGCCG CTTATGTCGA GAAGGCCT

【0138】配列番号: 48

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

配列

GACTCAGATC TTCCTGAGGC CGAT

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、合成hPr oPTH (1-84) 遺伝子作製に用いた合成オリゴマーの配列を示す。

【図2】図2は、合成hPr oPTH (1-84) 遺伝子の作製方法を示す。

【図3】図3は、プラスミドpG210S (S/X) の作製方法を示す図である。Placは大腸菌のラクトースオペロンのプロモーターを、Ttrpは大腸菌のTrpEのアテニューエーターターミネーターを示す。

【図4】図4は、キメラタンパク質βGal-139S (FM) PPH84を発現するプラスミドpGP#19の作製方法を示す。

【図5】図5は、キメラタンパク質βGal-139S (FM) PPH34を発現するプラスミドpGP#19 PPH34の作製方法を示す図である。

34

*鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: 合成DNA

31

※鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

※ 配列の種類: 合成DNA

57

★鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

★ 配列の種類: 合成DNA

48

☆鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

☆ 配列の種類: 合成DNA

36

◆鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

◆ 配列の種類: 合成DNA

53

*鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: 合成DNA

38

※鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

※ 配列の種類: 合成DNA

24

【図6】図6は、キメラタンパク質βGal-117S PPH34およびβGal-117SnHPPH34を発現するプラスミドpG117SPPH34とpG117SnHPPH34の作製方法の前半部分を示す図である (n=1~6)。pG97SPPH34とpG97SnHPPH34はプライマーS05をS04に変え、pG139SPPH34とpG139SnHPPH34はプライマーS05をS06に変え、作製した。

40

【図7】図7は、キメラタンパク質βGal-117S PPH34およびβGal-117SnHPPH34を発現するプラスミドpG117SPPH34とpG117SnHPPH34の作製方法の後半部分を示す図である (n=1~6)。pG97SPPH34とpG97SnHPPH34はプライマーS05をS04に変え、pG139SPPH34とpG139SnHPPH34は

50

35

プライマーS05をS06に変え、作製した。

【図8】図8は、ポリヒスチジンリンカー{(His)₄-Pro-Gly}_n (n=1~6)がキメラタンパク質の生産量に与える影響を調べたSDS-PAGEの結果を示した図である。図中4Hはヒスチジン残基が4個すなわち、n=1であることを示す。

【図9】図9は、Kex2-660によるhPTH(1-34)の切り出し効率に与えるポリヒスチジンリンカー{(His)₄-Pro-Gly}_n (n=1~6)の影響を示した図である。横軸はβGal-117SPH34のkcat値を1としたときの相対値を示した。

【図10】図10は、Kex2-660によるhPTH(1-34)の切り出し効率に与えるKex2プロテアーゼの認識部位P3のアミノ酸の影響を示した図である。P4のアミノ酸はバリン残基に固定し、P3部位のアミノ酸を置換した。横軸はβGal-117S4HVKPH34のkcat値を1としたときの相対値を示した。

【図11】図11は、Kex2-660によるhPTH(1-34)の切り出し効率に与えるKex2プロテアーゼの認識部位P4のアミノ酸の影響を示した図である。P3のアミノ酸はヒスチジン残基に固定し、P4部

36

位のアミノ酸を置換した。横軸はβGal-117S4HVKPH34のkcat値を1としたときの相対値を示した。

【図12】図12は、βGal-117KS4HRHPH34遺伝子の発現ベクターpGKSPH34の構造を模式的に示した図である。なお、βGal-117KSはβGal-117Sの14位のアルギニン残基がリジン残基に置換されているペプチドである。

【図13】図13は、プラスミドpG210ShCT(G)の作製方法を示す図である。

【図14】図14は、hGLP-1(7-37)遺伝子(DNA(1))作製用合成オリゴヌクレオチドの塩基配列、及びpGKSPH34を鋳型とするPCR用プライマーの塩基配列を示す図である。

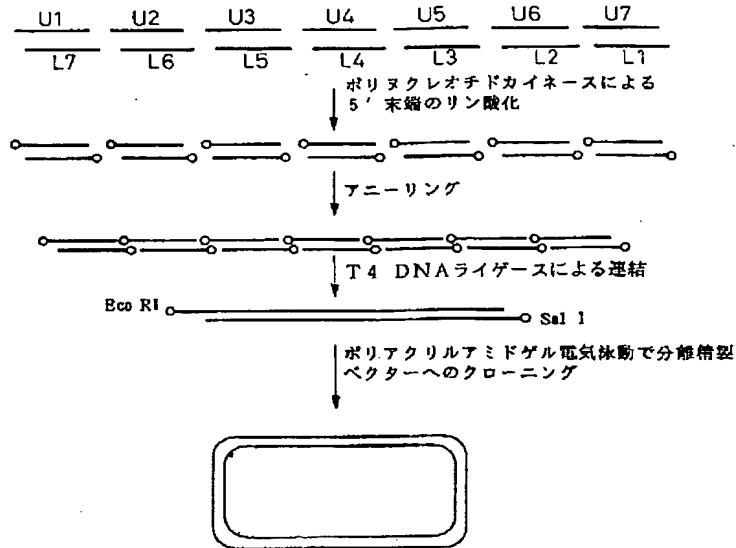
【図15】図15は、プラスミドpG117S4HGPの作製過程を示す図である。

【図16】図16は、hGLP-1の精製のプロフィールを示す図であり、AはKex2反応後、Bは酸性沈殿上清、Cは陽イオン交換カラム後、Dは低圧逆相カラム後の結果を示す。ピーク1はhGLP-1(7-37)、ピーク2はhGLP-1、ピーク3は保護ペプチド、ピーク4はキメラタンパク質を示す。

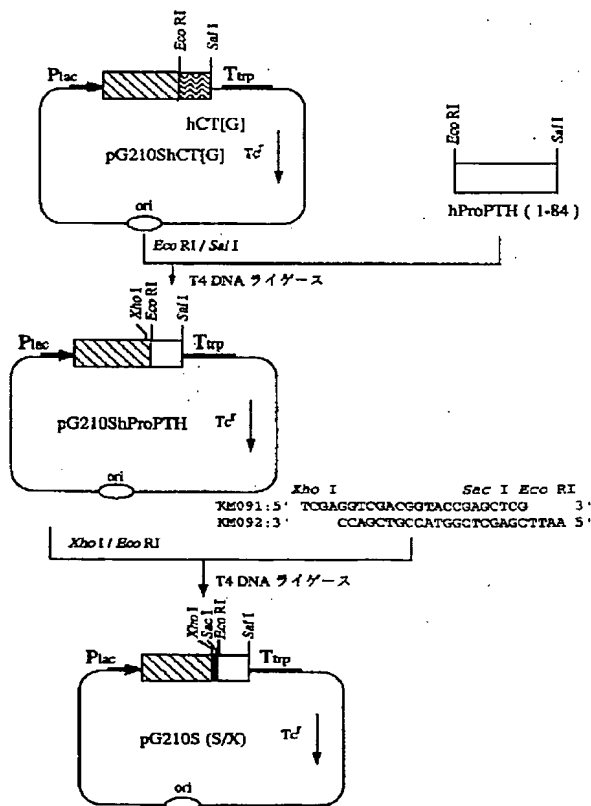
【図1】



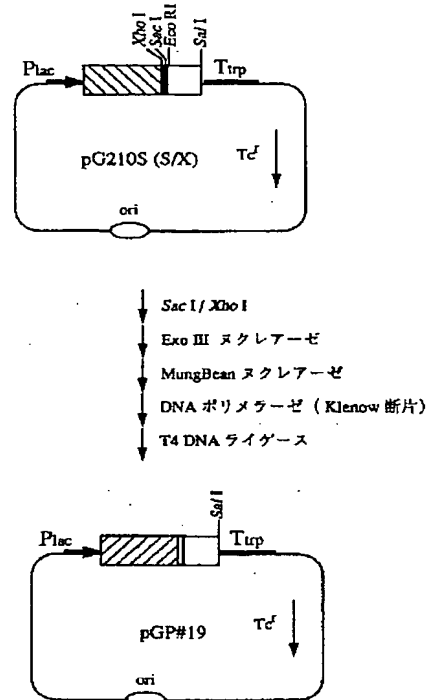
【図2】



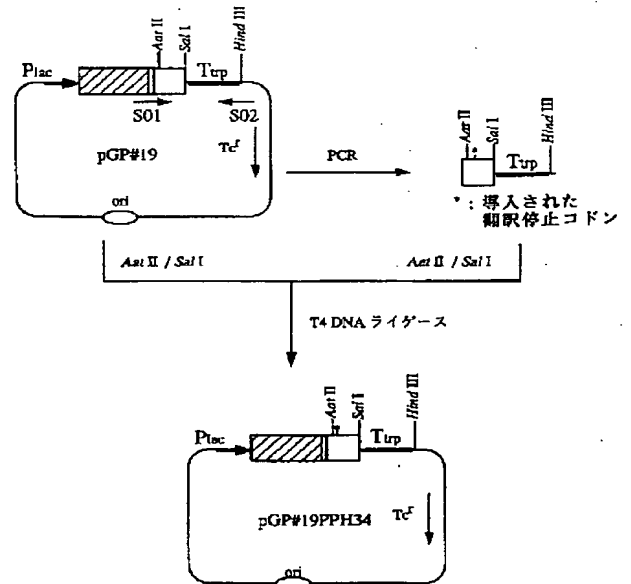
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

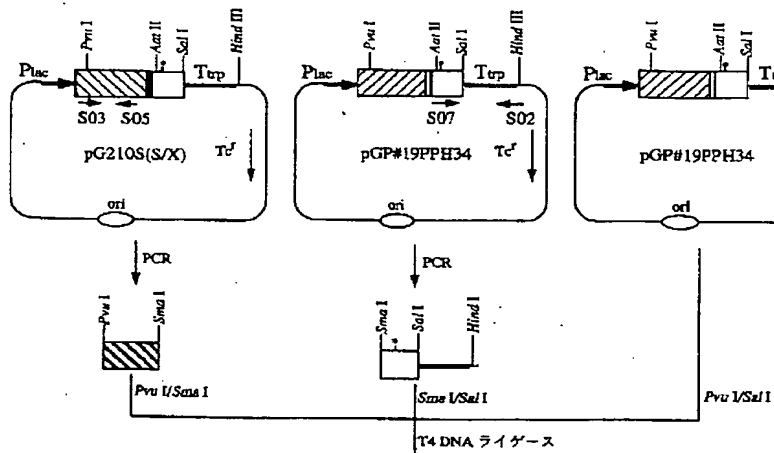
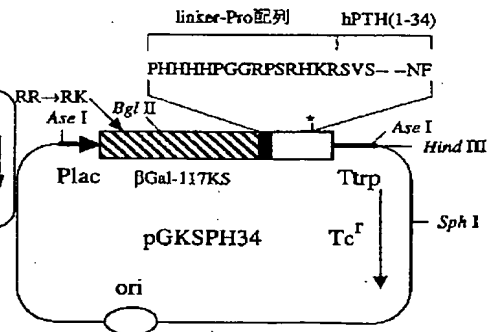
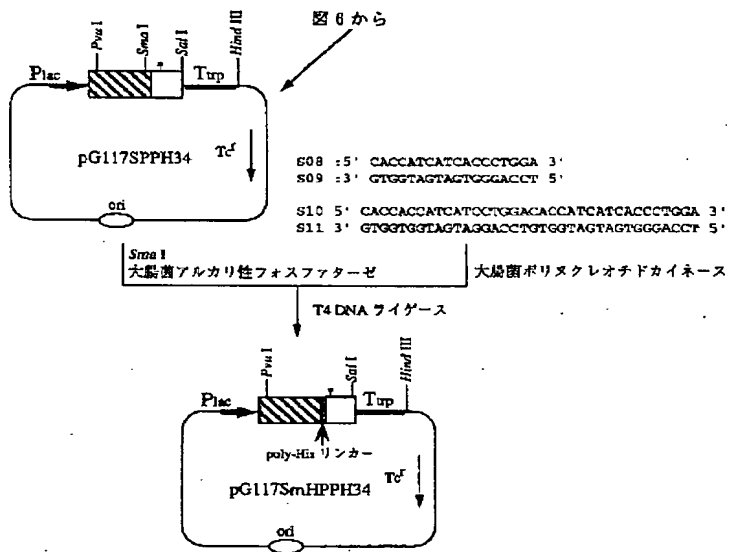


図7へ続く

【図12】

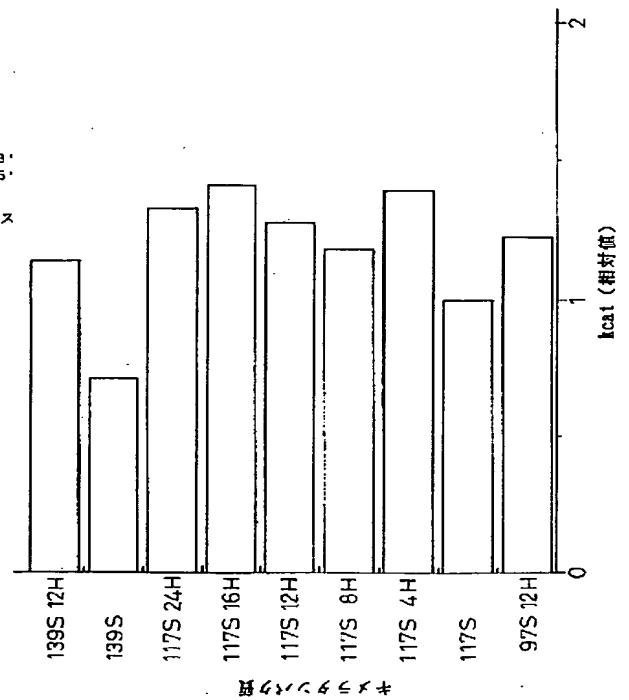


【図7】



【図9】

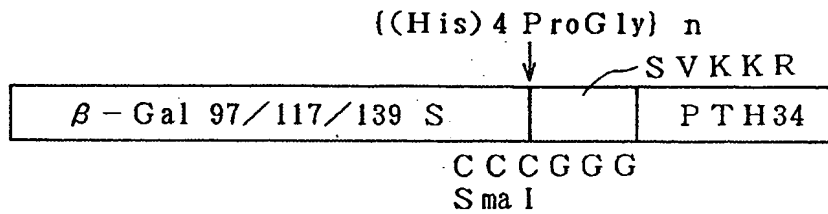
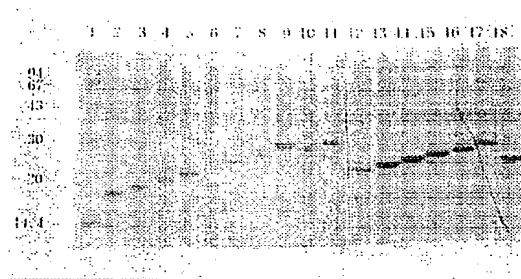
ポリヒスチジンリンカー挿入の影響



【図8】

図面代用写真

PTH融合蛋白生産性に対するポリヒスチジン挿入の影響

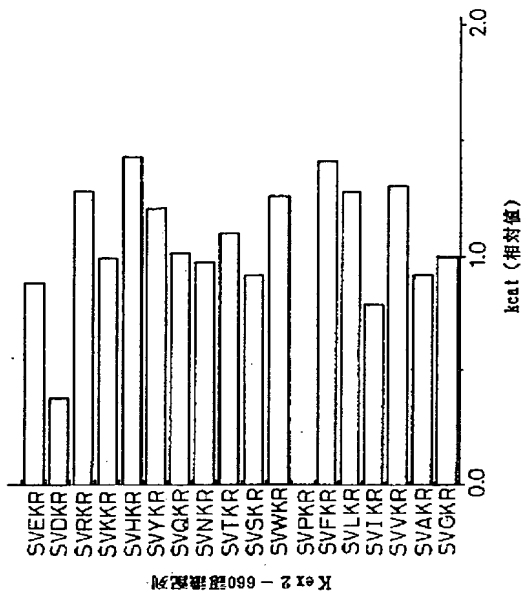


- | | |
|---------------------|---------------------|
| 1 スタンダード | 12 βGal 117S |
| 2 βGal 97S | 13 βGal 117S 4 H |
| 3 βGal 97S 4 H | 14 βGal 117S 8 H |
| 4 βGal 97S 8 H | 15 βGal 117S 12H |
| 5 βGal 97S 12H | 16 βGal 117S 16H |
| 6 βGal 97S 4 K | 17 βGal 117S 24H |
| 7 βGal 97ShANP | 18 βGal 117S 4 K |
| 8 βGal 139S | |
| 9 βGal 139S 8 H | |
| 10 βGal 139S 4 K | |
| 11 βGal 139S 12H | |

スタンダードの分子量は図左端にkd単位で記載

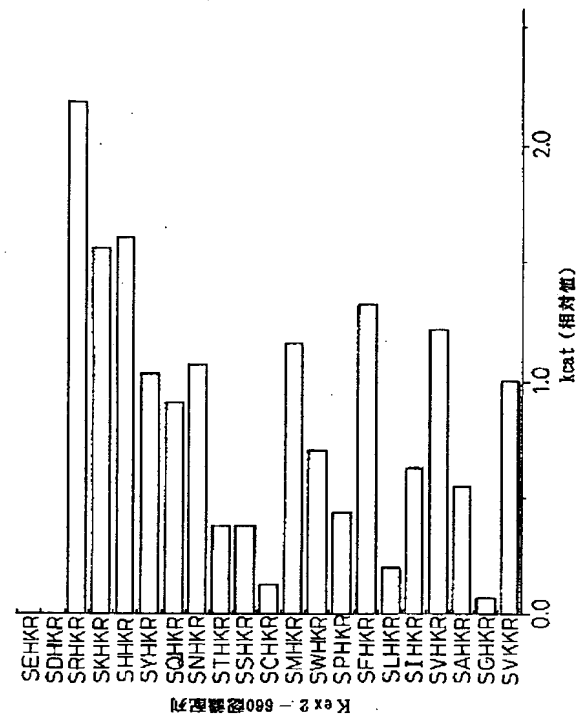
【図10】

P3サイトアミノ酸の影響

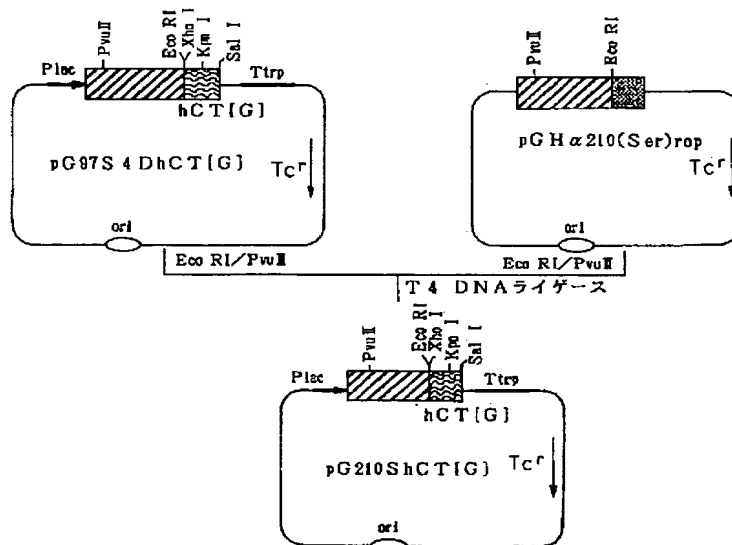


【図11】

P4サイトのアミノ酸の影響



【図13】



(a) GLP 1-37[Gly] 合成 DNA

GLP-3 5' AA TTC ATC GCG TGG CTG GTG AAA GGC CGT GGT TAA G 3'
GLP-4 3' GTC CGC CGT TTT CTT AAG TAG CGC ACC GAC CAC TTT CCG GCA CCA ATT CAGCT 5'

(b) PCR プライマー

117S4H Bcl II プライマー
5' GAC TCA GAT CTT CCT GAG GCC GAT 3'
Bcl II

lacPO BglII SalI Tc 117S 4H BglII プライマー
 βGal-117KS4HRH PH34
 pGKSPH34

lacPO BglII SalI Tc 117S 4H SphI プライマー
 βGal-117KS4HRH PH34
 pGKSPH34

GLP-1
 GLP-2
 GLP-8
 GLP-4
 T4
 ポリヌクレオチド
 カイネース
 ↓
 アニールング

PCR

BglII-SalI 消化
 大きい方の断片を回収
 (DNA II)

SphI SalI
 (DNA I)

BglII-SphI 消化
 (DNA II)

T4 DNAリガーゼ

lacPO BglII SphI SalI Tc
 βGal-117KS4HRH GLP1-3XG17
 pGI17S4 HGP

The figure displays four NMR spectra, labeled A, B, C, and D, arranged horizontally. Each spectrum shows a baseline with several sharp, vertical peaks. Spectrum A (leftmost) has four peaks labeled 1, 2, 3, and 4. Peak 1 is the tallest, followed by peak 2, then peak 3, and peak 4 is the shortest. Spectrum B has two peaks labeled 1 and 3. Peak 1 is significantly taller than peak 3. Spectrum C has two peaks labeled 1 and 2. Peak 1 is much taller than peak 2. Spectrum D (rightmost) has two peaks labeled 1 and 2. Peak 2 is the tallest, and peak 1 is slightly shorter. The labels 1 and 2 are placed directly above their respective peaks in each spectrum.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02			C 1 2 N 9/50	
// C 1 2 N 9/50		9282-4B	15/00	Z N A A
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				